

PCT REQUEST

9FPO-12-02

Original (for SUBMISSION) - printed on 21.12.1999 03:35:13 PM

0 0-1	For receiving Office use only International Application No.	PCT/KR9 9 / 0 0 7 9 6
0-2	International Filing Date	21 December 1999 (21. 12. 99)
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	Korean Industrial Property Office P C T International Application
0-4 0-4-1	Form - PCT/RO/101 PCT Request Prepared using	PCT-EASY Version 2.90 (updated 06.12.1999)
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	Korean Industrial Property Office (RO/KR)
0-7	Applicant's or agent's file reference	9FPO-12-02
I	Title of invention	ARGININE-RICH ANTI-VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR PEPTIDES THAT INHIBIT GROWTH AND METASTASIS OF HUMAN TUMOR CELLS BY BLOCKING ANGIOGENESIS
II II-1 II-2 II-4 II-5	Applicant This person is: Applicant for Name Address:	applicant only all designated States except US KOREA GREEN CROSS CORPORATION 227 Kugal-ri, Kiheung-eup, Yongin-si, 449-900 Kyunggi-do Republic of Korea
II-6 II-7 II-8 II-9 II-10	State of nationality State of residence Telephone No. Facsimile No. e-mail	KR KR 82-2-3453-0507 82-2-3453-8155 wonpat@chollian.net
III-1 III-1-1 III-1-2 III-1-4 III-1-5	Applicant and/or inventor This person is: Applicant for Name Address:	applicant only all designated States except US POSTECH FOUNDATION San 31, Hyoja-dong, Nam-ku, Pohang-si, 790-784 Kyungsangbuk-do Republic of Korea
III-1-6 III-1-7	State of nationality State of residence	KR KR

PCT REQUEST

9FPO-12-02

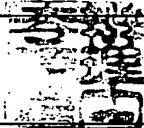
Original (for SUBMISSION) - printed on 21.12.1999 03:35:13 PM

III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is:	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	CHAE, Chi Bom
III-2-5	Address:	#8-1303 Kyosu Apt., Chigok-dong, Nam-ku, Pohang-si, 790-390 Kyungsangbuk-do Republic of Korea
III-2-6	State of nationality	KR
III-2-7	State of residence	KR
III-3	Applicant and/or inventor	
III-3-1	This person is:	applicant and inventor
III-3-2	Applicant for	US only
III-3-4	Name (LAST, First)	BAE, Dong Goo
III-3-5	Address:	756 Chigok-dong, Nam-ku, Pohang-si, 790-390 Kyungsangbuk-do Republic of Korea
III-3-6	State of nationality	KR
III-3-7	State of residence	KR
III-4	Applicant and/or inventor	
III-4-1	This person is:	applicant and inventor
III-4-2	Applicant for	US only
III-4-4	Name (LAST, First)	YOON, Wan Hee
III-4-5	Address:	#13-903 Karam Apt., Samcheon-dong, Seo-ku, 302-222 Taejon, Republic of Korea
III-4-6	State of nationality	KR
III-4-7	State of residence	KR
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence	
	The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	LEE, Won-hee
IV-1-2	Address:	Suite 805 Sungji Heights II 642-16 Yoksam-dong, Kangnam-ku, 135-080 Seoul Republic of Korea
IV-1-3	Telephone No.	82-2-3453-0507
IV-1-4	Facsimile No.	82-2-3453-8155
IV-1-5	e-mail	wonpat@chollian.net
V	Designation of States	
V-1	Regional Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT

PCT REQUEST

9FPO-12-02

Original (for SUBMISSION) - printed on 21.12.1999 03:35:13 PM

V-2	National Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	CA JP US	
V-5	Precautionary Designation Statement In addition to the designations made under items V-1, V-2 and V-3, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) of the State(s) indicated under item V-6 below. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit.		
V-6	Exclusion(s) from precautionary designations	NONE	
VI	Priority claim	NONE	
VII-1	International Searching Authority Chosen	Korean Industrial Property Office (KIPO) (ISA/KR)	
VIII	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
VIII-1	Request	4	-
VIII-2	Description (excluding sequence listing part)	32	-
VIII-3	Claims	2	-
VIII-4	Abstract	1	abstract.txt
VIII-5	Drawings	20	-
VIII-6	Sequence listing part of description	2	-
VIII-7	TOTAL	61	
	Accompanying items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
VIII-8	Fee calculation sheet	✓	-
VIII-9	Separate signed power of attorney	✓	-
VIII-9	Separate signed power of attorney	✓	-
VIII-16	PCT-EASY diskette	-	diskette
VIII-18	Figure of the drawings which should accompany the abstract	4	
VIII-19	Language of filing of the international application	Korean	
IX-1	Signature of applicant or agent		
IX-1-1	Name (LAST, First)		

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	21 December 1999 (21.12.99)
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	

PCT REQUEST

9FPO-12-02

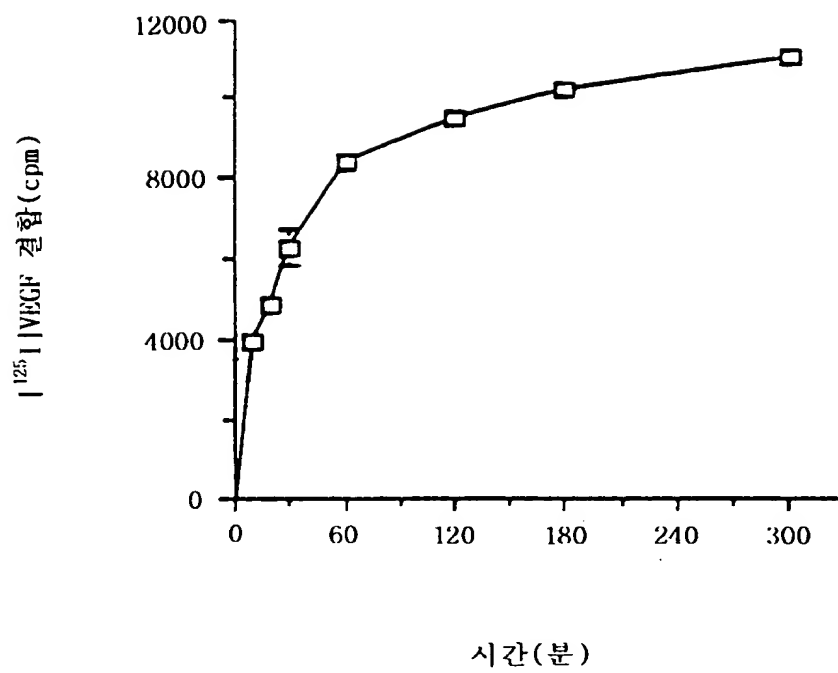
Original (for SUBMISSION) - printed on 21.12.1999 03:35:13 PM

10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/KR
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

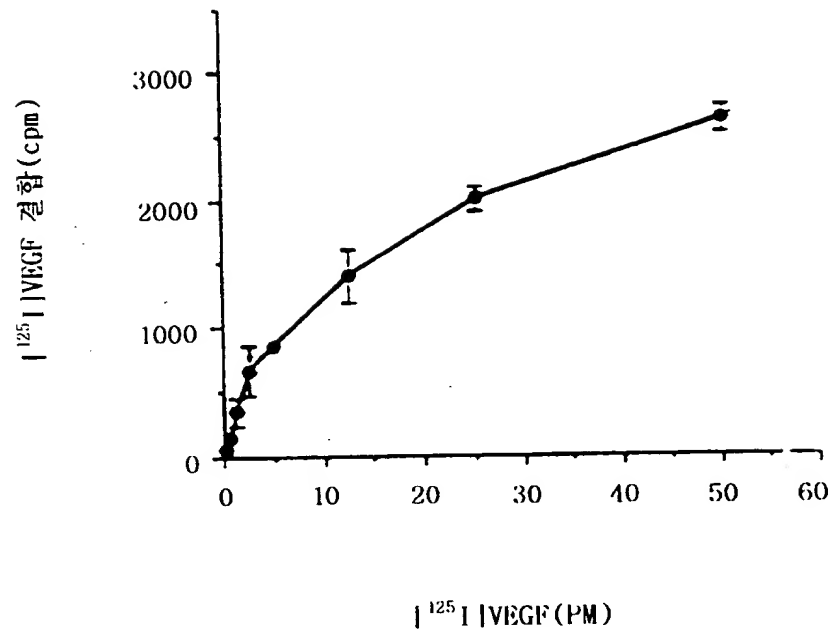
FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	04 JANUARY 2000 (04.01.00)
------	--	----------------------------

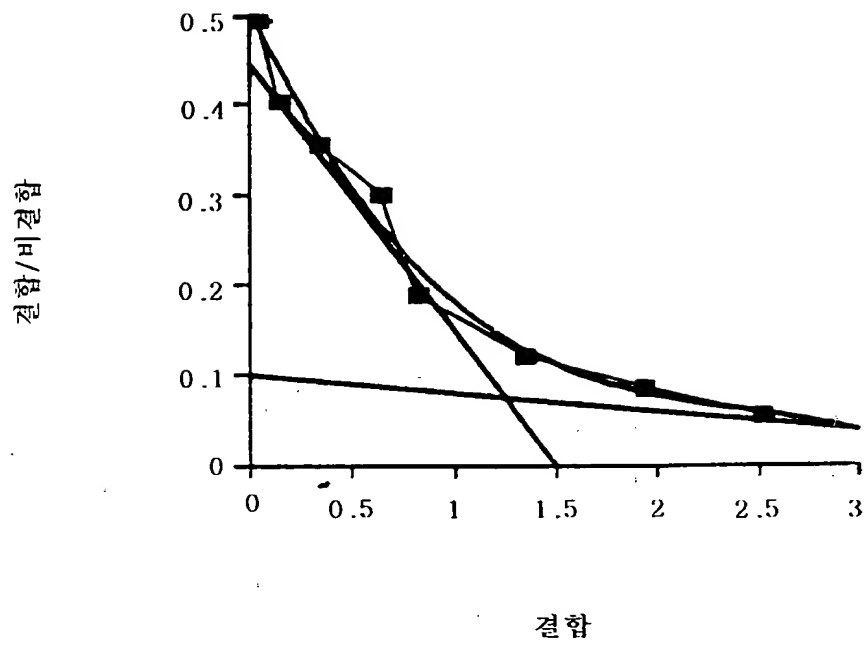
도 1a



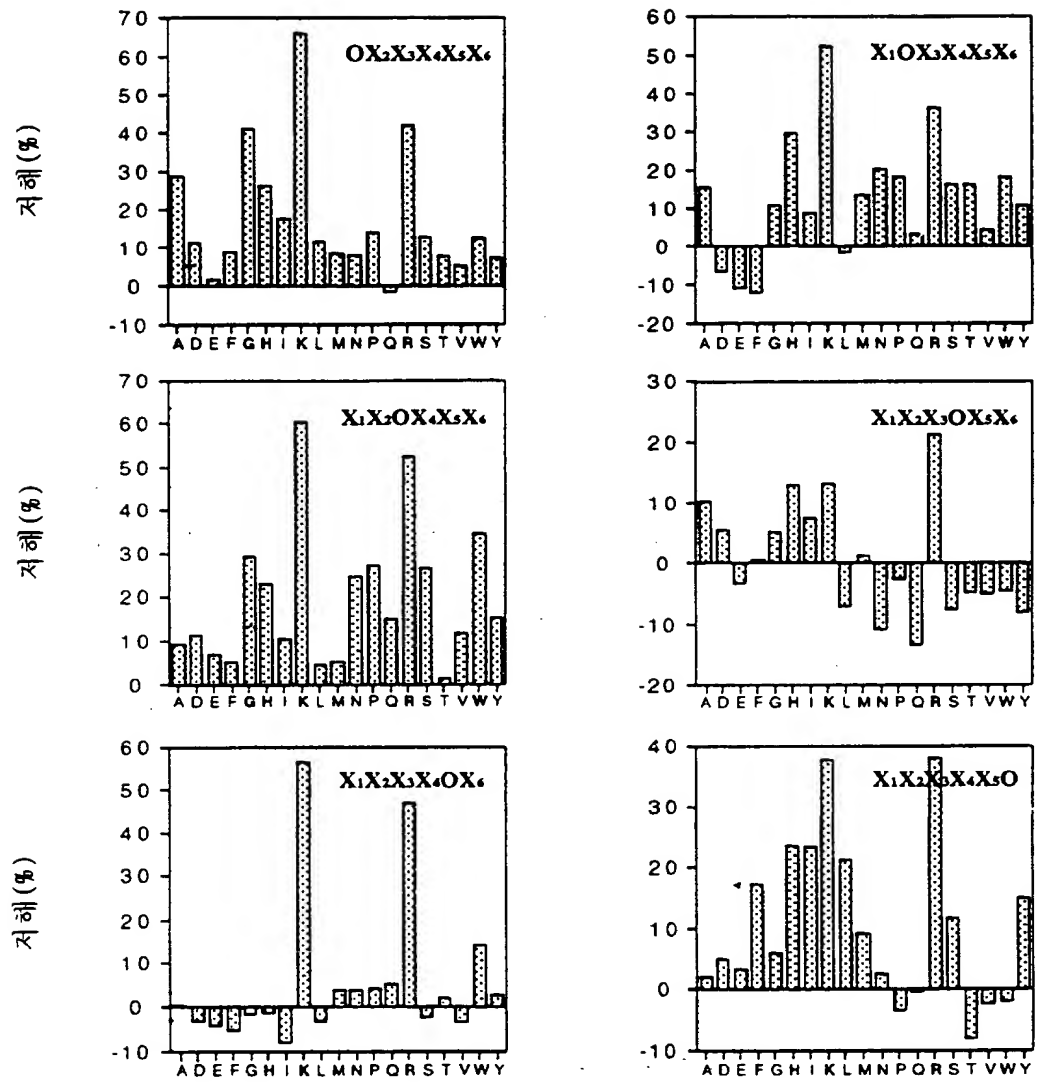
도 1b



도 1c



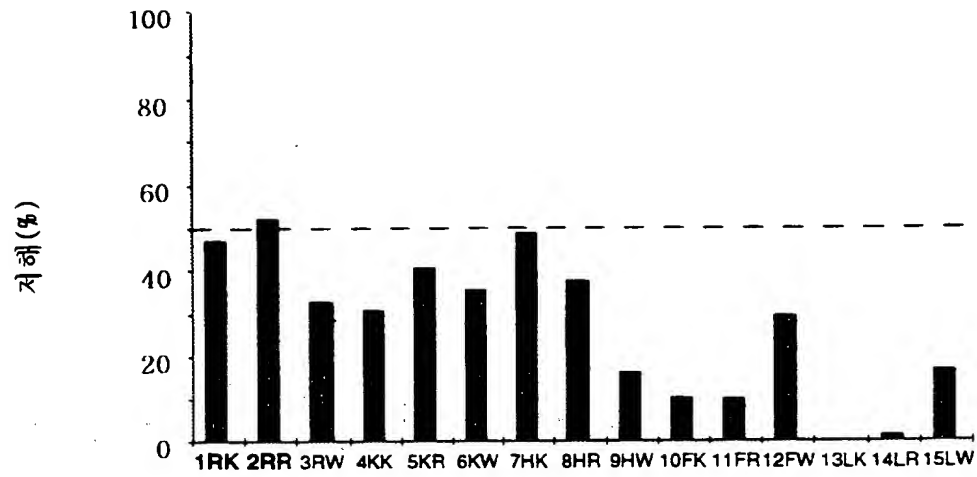
도 2



특정된 아미노산

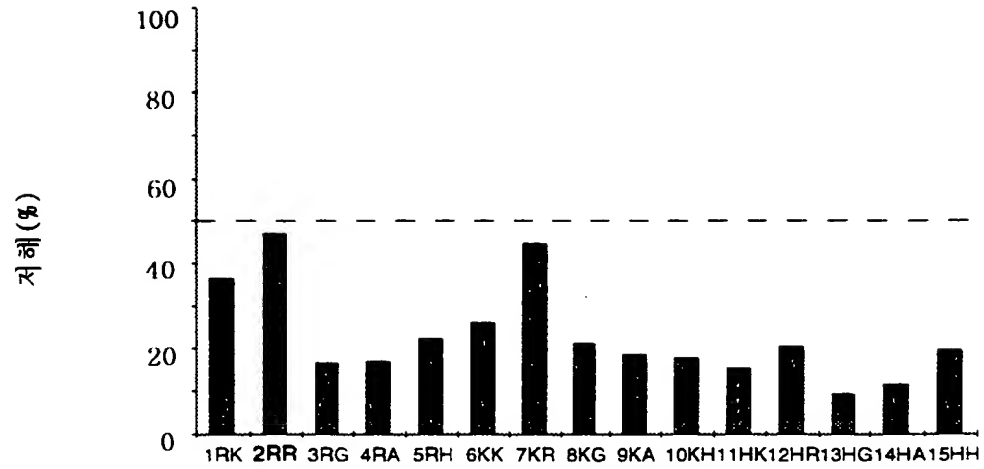
특정된 아미노산

도 3a



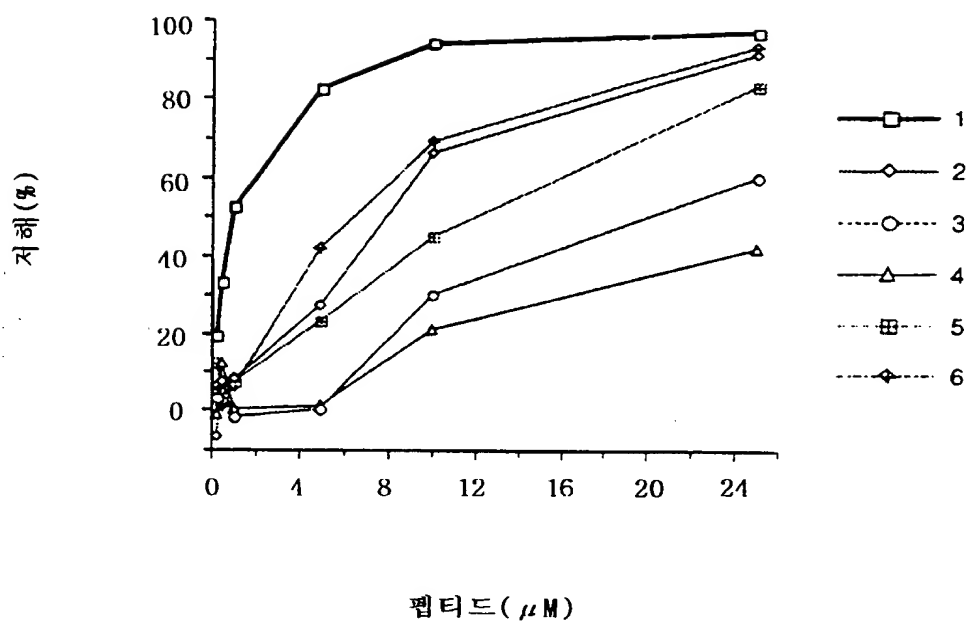
펩티드 풀 (100nM/서열)

도 3b

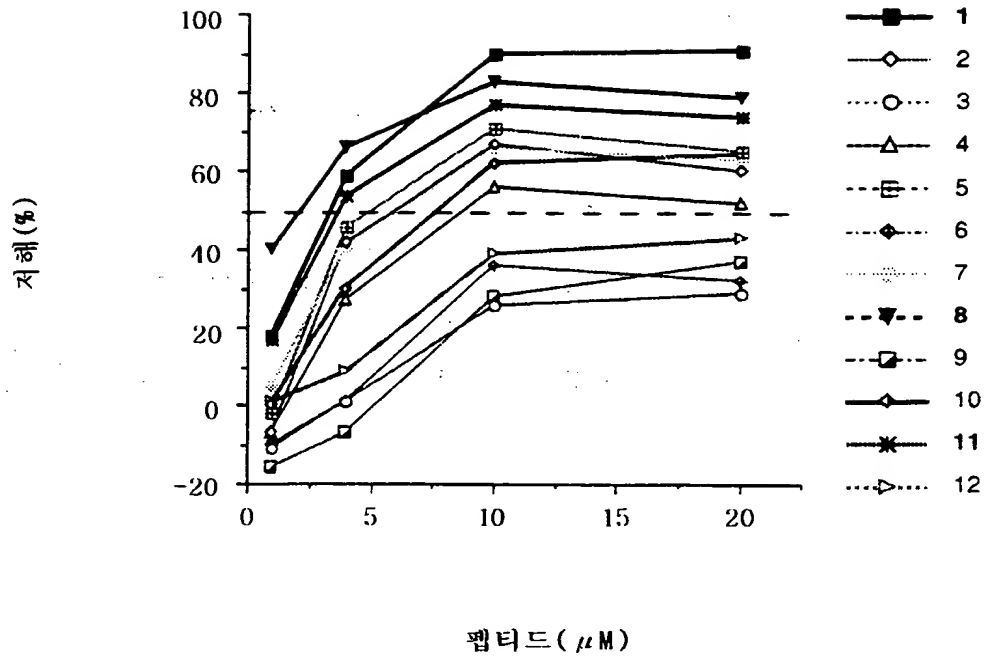


펩티드 풀 (250nM/서열)

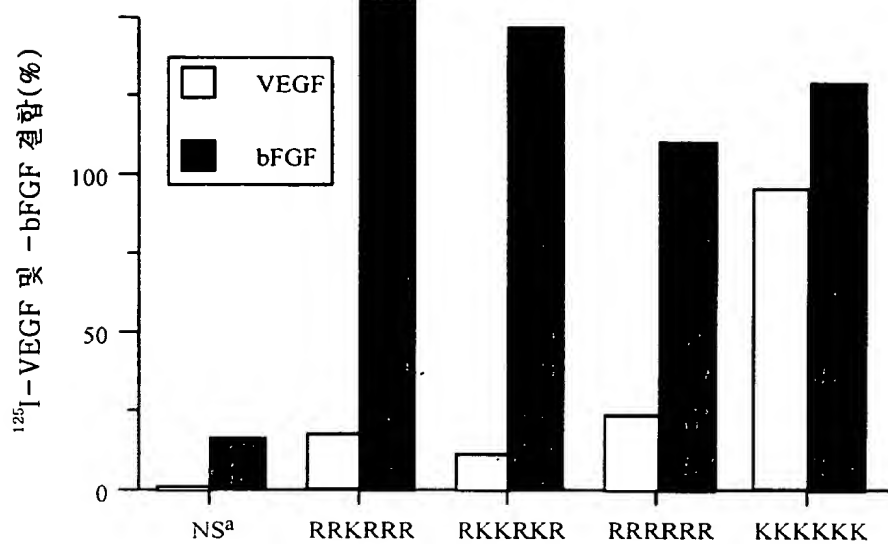
도 4



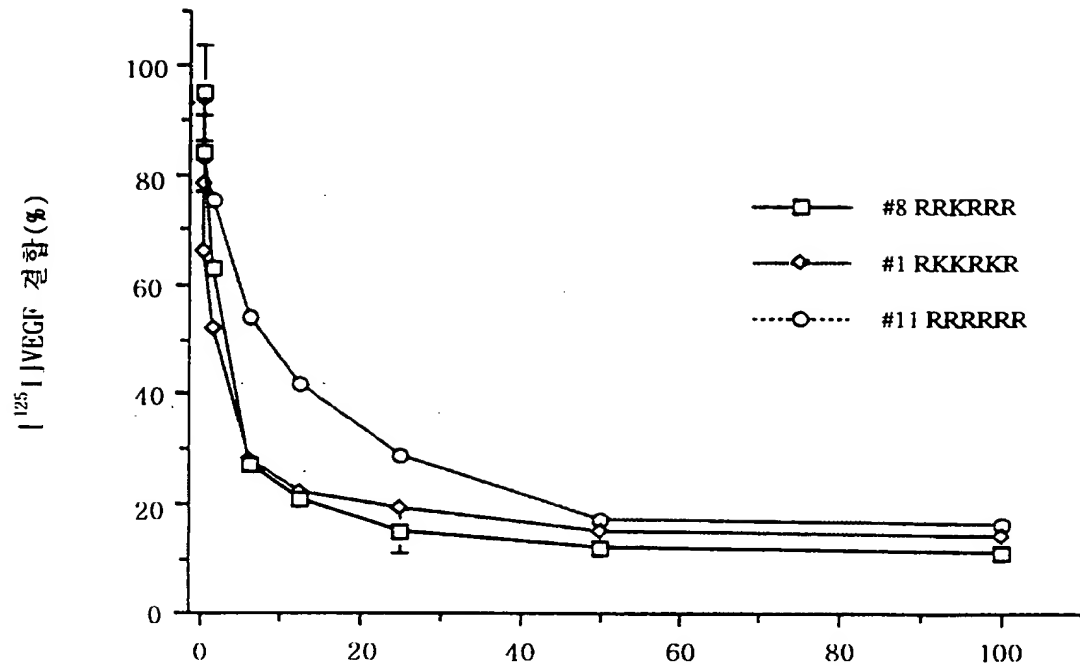
도 5



도 6

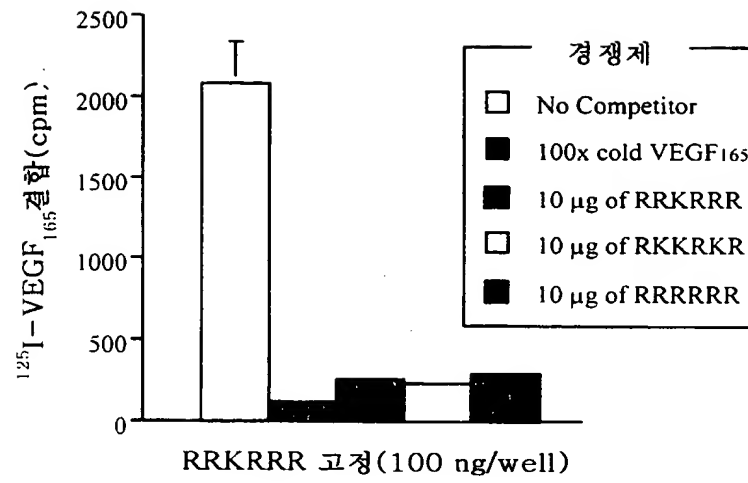


도 7

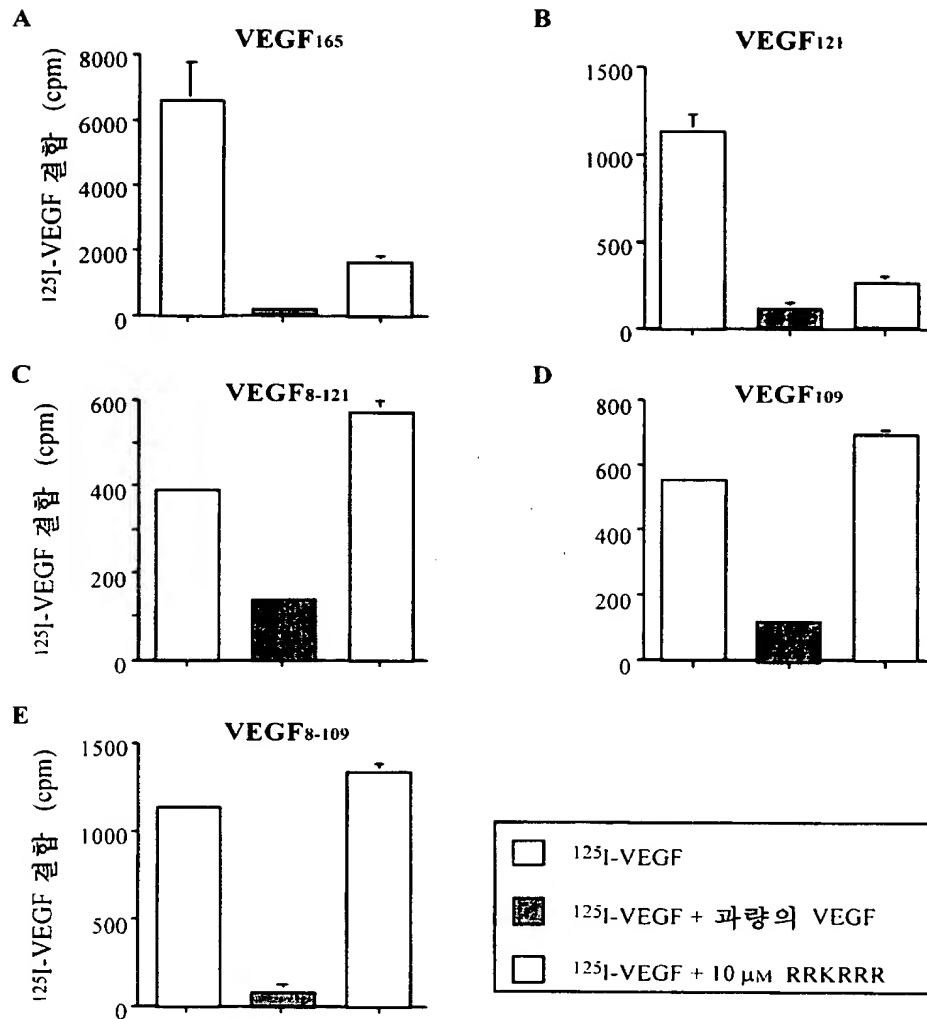


경쟁제의 배율

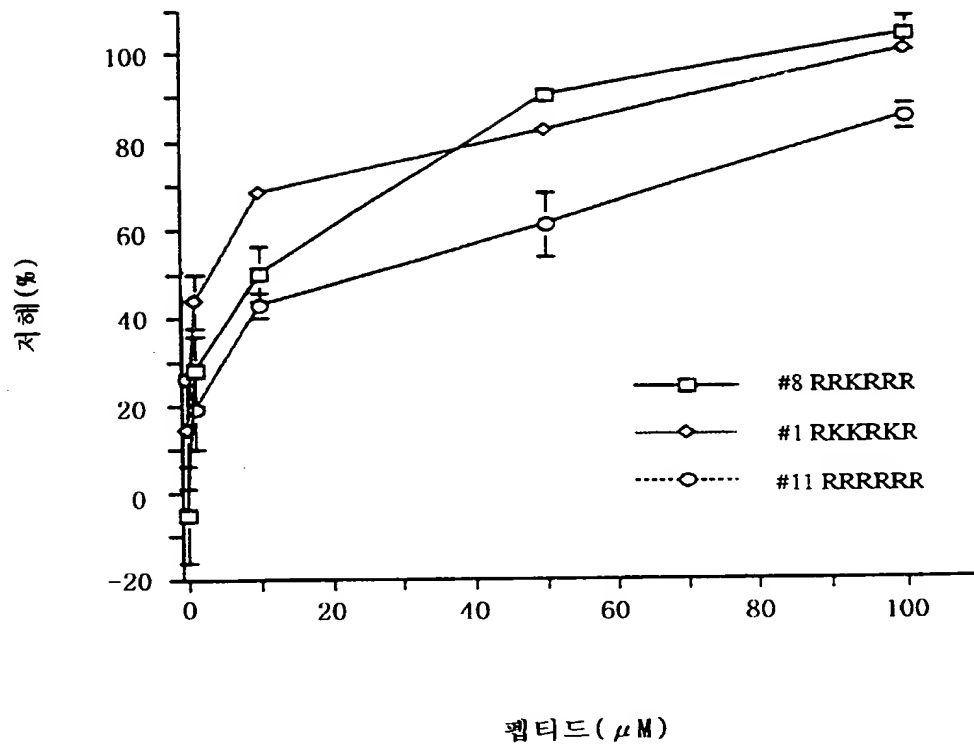
도 8



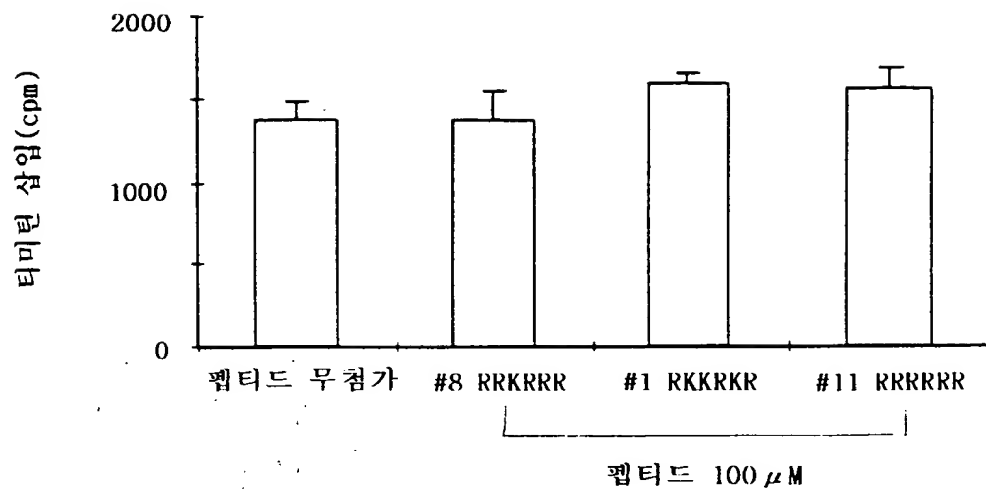
도 9



도 10a



도 10b



11

A



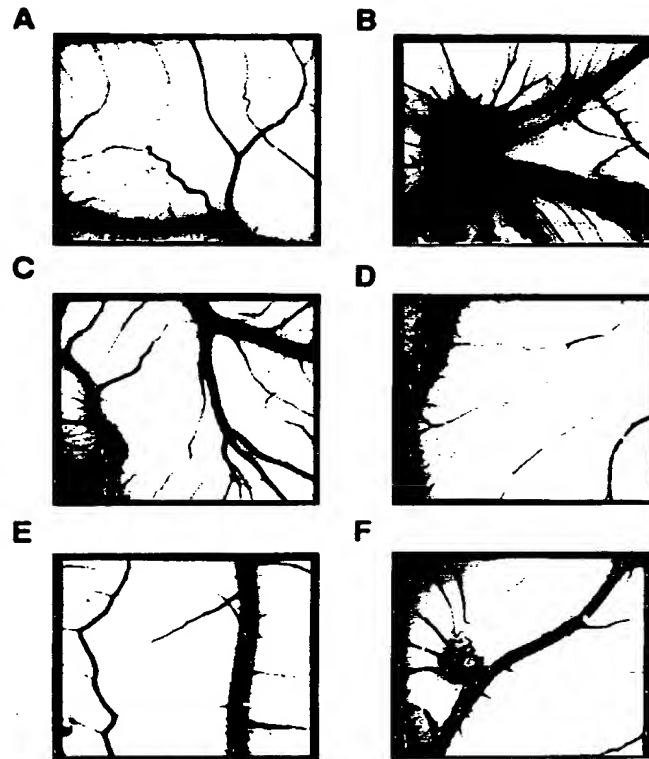
B



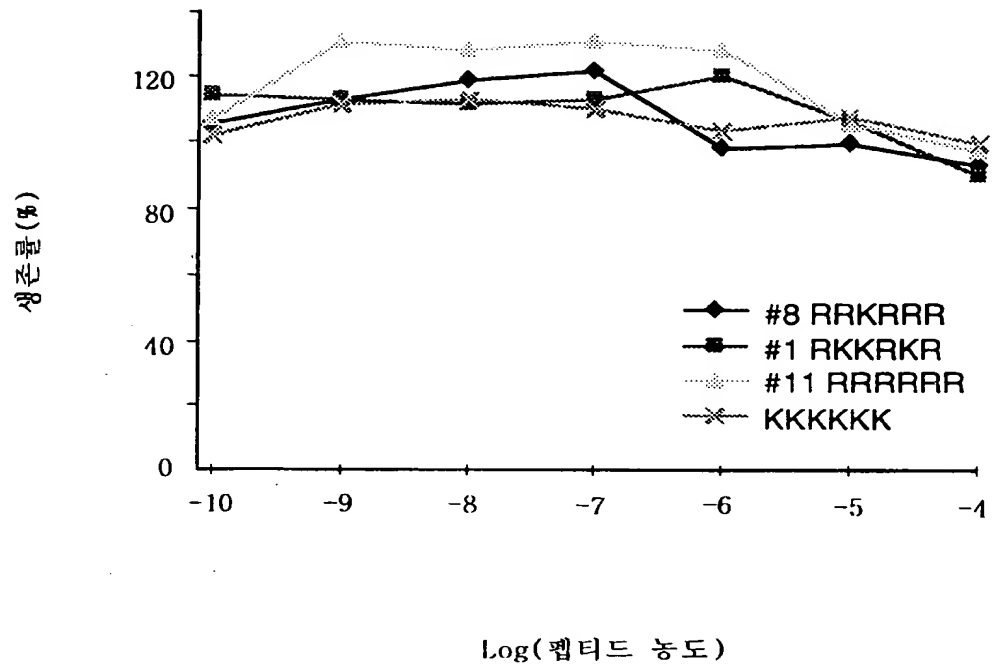
C



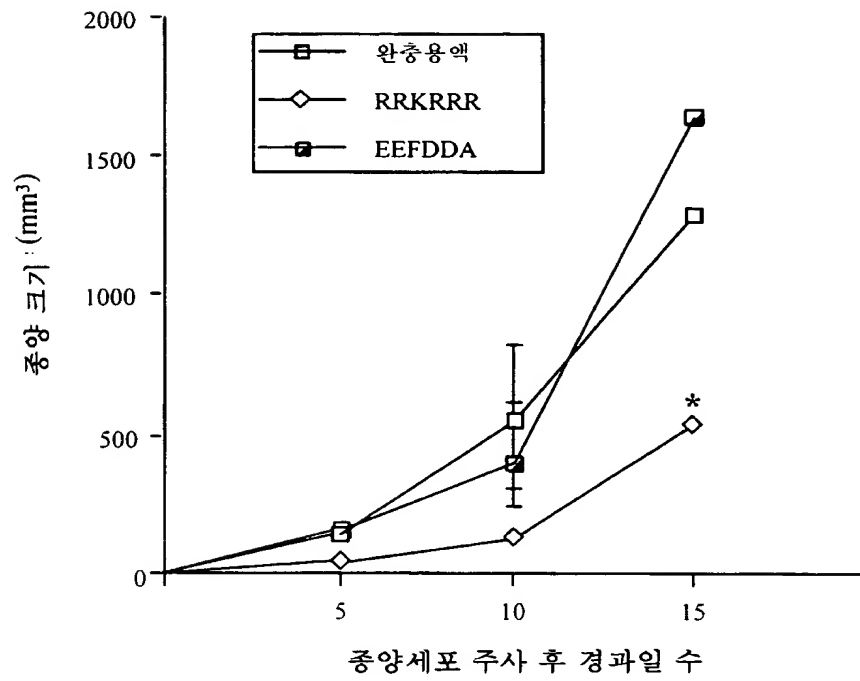
도 12



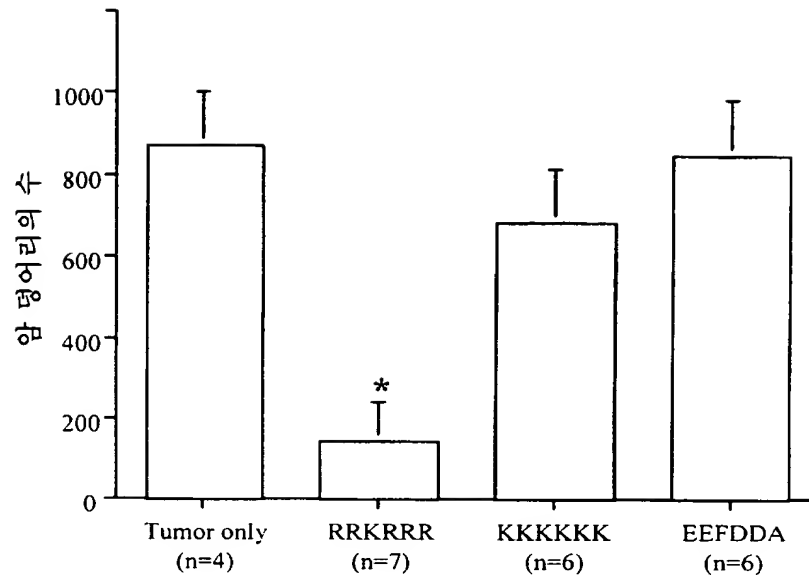
도 13



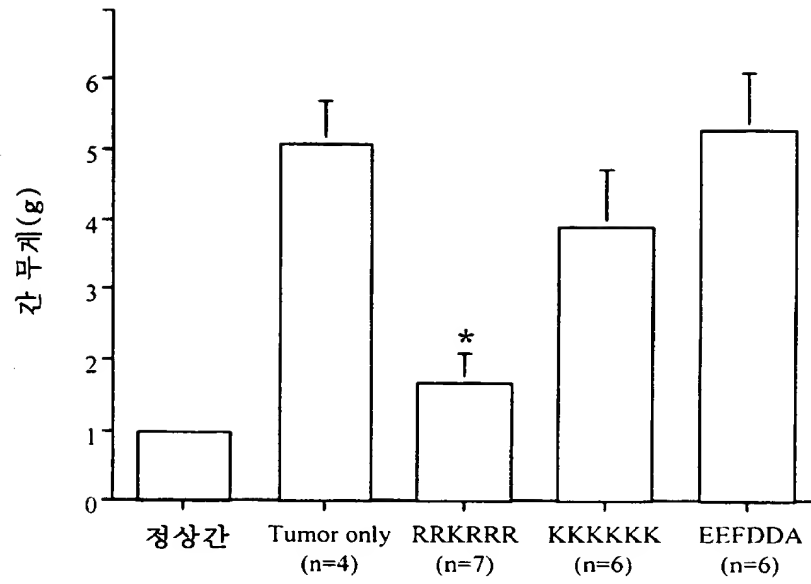
도 14



도 15a



도 15b



SEQUENCE LISTING

<110> Korea Green Cross Corporation
Pohang University of Science and Technology

<120> Arginine-rich anti-vascular endothelial growth factor
peptides that inhibit growth and metastasis of human tumor cells
by blocking angiogenesis

<130> 9fpo-12-02

<160> 3

<170> KOPATIN 1.5

<210> 1
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptide

<400> 1
Arg Arg Lys Arg Arg Arg
1 5

<210> 2
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptide

<400> 2
Arg Lys Lys Arg Lys Arg
1 5

<210> 3
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptide

<400> 3
Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

혈관벽세포 성장호르몬 활성을 저해하는 새로운 항암, 항전이 펩티드

기술분야

본 발명은 신 혈관형성 유도물질인 혈관벽 세포 성장 호르몬(vascular endothelial growth factor, 이하 'VEGF'로 약칭함) 활성을 저해하는 새로운 펩티드 및 이를 항암제, 신 혈관형성과 관련된 질병의 치료제로 사용하는 용도에 관한 것이다.

배경기술

신 혈관형성(angiogenesis)이란 기존의 혈관으로부터 새로운 혈관이 형성되는 과정을 일컫는 용어로, 정상적인 개체의 경우, 상처가 치유될 때나 기관이 형성되는 과정에서 신 혈관형성이 유도되며, 이러한 신 혈관형성은 필요한 시기와 장소에서 정해진 기간만 활성을 가지며, 생체 내에서는 신 혈관형성 유도물질과 저해물질들간의 평형에 의해 세밀하게 조절되고 있다(Loitta, L. A. et al., Cell, 64, 327 (1991)).

이러한 신 혈관형성의 정교한 조절기작의 실패가 당뇨병 실명증과 류마티스 관절염을 포함한 여러 가지 질병들의 원인이 되는 것으로 알려져 있다(Kohn, E. C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 1307 (1995); Folkman, J. et al., Science, 235, 442 (1997); Risau, W., Nature, 386, 671 (1997)). 또한, 혈액을 통한 원활한 영양분 공급을 가능하게 하고, 전이암의

이동통로를 제공하기 때문에 암세포의 성장과 전이에도 신 혈관형성 과정이 필수적이라는 사실이 밝혀졌다(Hanahan, D. et al., Cell, 86, 353 (1996); Skobe, M. et al., Nature Med., 3, 1222 (1997)). 구체적으로 암세포로 형성된 종양이 직경 2 mm 이상의 크기로 성장을 하려면 산소와 영양분의 공급과 세포의 성장에 유해한 대사산물을 처리해 줄 수 있는 새로운 혈관의 형성이 필수적인 것이고(Fidler, I. J. et al., Cell, 79, 185 (1994)), 또한 암세포의 전이도 암세포나 정상적인 조직 세포에 의해 분비된 여러 가지 신 혈관형성 유도 물질들에 의해 만들어진 새로운 모세혈관 망을 통해서 가속화 될 수 있다(Blood, C. H. et al., Biochem. Biophys. Acta., 1032, 89 (1990)).

암 치료에 있어 기존의 항암제나 치료법이 지닌 한계는 단일 종양 내에도 매우 다양한 암세포가 존재하며, 암세포는 정상 세포보다 빠른 돌연변이 속도와 성장 속도를 가지고 있어서 투여된 항암제들에 빠른 내성을 보인다는 것이다. 그러나 신 혈관형성 저해를 통한 암 치료방법은 암세포가 아닌 숙주의 정상 세포(혈관벽 세포)의 성장을 막기 때문에, 기존의 암치료법들이 갖는 한계의 원인이 된 암세포의 다양성과 항암제에 대한 암세포의 내성 형성 등의 문제점들을 극복할 수 있을 것으로 생각되며, 기존 암치료법 보다 신 혈관형성 저해를 통한 암 치료의 우수성은 여러 사람들의 동물시험 결과들이 뒷받침해주고 있다(Burrows, F. J. et al., Pharmac. Ther., 64, 155 (1994)).

생체 내에서는 신 혈관형성 유도물질(angiogenic factor)과 억제물질(antiangiogenic factor)들이 공존하여 이들간의 평형에 의해 신 혈관형성이

정교하게 이루어지고 있으며, 현재까지 수집 종의 암세포와 연관된 신 혈관형성 관련 물질들이 알려져 있는데, 이들 중 대부분은 내피세포에 성장호르몬으로 작용하지 않는다(Bussolino, F. et al., Trends. Biochem. Sci., 22, 251 (1997)). 반면, 내피세포 성장 호르몬(VEGF)은 *in vitro*에서 강력한 내피세포 특이적 성장 인자로 작용하며(Gospodarowicz, D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 7311 (1989)), 혈관의 투과성을 증가시키며(Leung, D. W. et al., Science, 246, 1306 (1989)), 암의 진행과 관련된 혈관신생을 *in vivo*에서 유도하는 것으로 알려져 있다(Plouet, J. et al., EMBO J., 8, 3801 (1989)).

VEGF은 강력한 신 혈관형성 유도 단백질의 하나로 저산소증(hypoxia)을 포함한 다양한 자극에 의해 발현이 유도되며, 이를 분비하는 인간 암세포들의 생체 내에서의 성장 및 전이에 필수적으로 요구된다는 것이 단일 항체를 이용한 실험을 통해 알려져 있다(Connolly, D. T. et al., J. Biol. Chem. 264, 20017 (1989); Kim, K. J. et al., Nature 362, 841 (1993)). VEGF는 헤파린(heparin)과 결합하며, PlGF(placental growth factor)와 PDGF(platelet-derived growth factor)와 아미노산 서열상의 유사성을 보인다(Conn, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87, 2628 (1990); Keck, P. I. et al., Science, 246, 1309 (1989); Maglione, D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88, 9267 (1991)). 또한, VEGF는 스플라이싱에 의해 각각 121, 165, 189 및 206 개의 아미노산을 가지는 이성체의 형태로 발현되며

(Tischer, E. et al., J. Biol. Chem., 266, 11947 (1991)), 이 중 VEGF₁₂₁은 헤파린(heparin)과 결합하지 않는다.

VEGF은 혈관벽 내피세포에만 특이적으로 발현되는 수용체(KDR/Flk-1, Flt-1)와의 결합을 통한 신호전달이 성장 호르몬으로서의 활성을 나타내는 데 필수적인 것으로 알려져 있다(Millauer, B. et al., Cell, 72, 835 (1993), De Vries, C., et al., Science 255, 989 (1992)). 배 발생과정의 혈관형성(vasculogenesis)과 혈관신생에서 VEGF의 중요성은 내피세포 성장호르몬과 그 수용체들의 발현을 저하시킨 쥐의 연구(Fong, G.h. et al., Nature, 376, 66 (1995); Shalaby, F. et al., Nature, 376, 62 (1995); Carmeliet, P. et al., Nature, 380, 435 (1996); Ferrara, N. et al., Nature, 380, 439 (1996)), 암 세포에 VEGF를 과발현 시켰을 때 암세포의 악성화 증진(Zang, H. T. et al., J. Natl. Cancer Inst., 87, 213 (1995)) 및 VEGF의 중화 단일항체(neutralizing monoclonal antibody)와 Flt-1 수용체의 발현에 의한 암 세포의 성장저해(Kim, K. J. et al., Nature, 362, 841 (1993), Goldman, C. K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 95, 8975 (1998)) 등의 연구에 의해 입증되었다. 이밖에도 VEGF이 신 혈관형성 과정에서 중심적인 역할을 할 것이라는 증거들이 계속 나오고 있다.

따라서, VEGF과 그 수용체간의 결합을 저해하는 물질은 VEGF이 유도하는 신 혈관형성을 저해할 수 있을 뿐만 아니라, VEGF을 분비하는 암세포의 성장과 전이도 저해할 수 있을 것이다(Martiny-Baron, G. et al., Curr. Opin.

Biotechnol., 6, 675 (1995)).

발명의 요약

본 발명은 신 혈관형성 및 암세포의 성장과 전이를 저해할 수 있는 VEGF 길항작용 펩티드를 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

도면의 간단한 설명

도 1a는 VEGF이 ^{125}I 로 표지된 후에도 결합시간에 의존적으로 인간의 태 줄에서 유래한 혈관벽세포(human umbilical vein endothelial cell)에 결합함을 보여주는 것이고,

도 1b는 VEGF이 ^{125}I 로 표지된 후에도 VEGF 농도에 의존적으로 인간의 태 줄에서 유래한 혈관벽세포에 결합함을 보여주는 것이고,

도 1c는 도 1b에서 얻은 결과를 스캐차드(Scatchard) 분석법을 통해 혈관벽 세포 표면에 두가지 종류의 수용체가 존재함을 확인한 것을 나타낸 것이고,

도 2는 펩티드 무작위 서열 혼합물을 이용하여 VEGF과 그 수용체간의 결합을 억제하는 펩티드를 찾기 위한 1차 검색의 결과이고,

도 3a는 1차 검색의 결과에 기초하여 합성한 첫 번째 2차 펩티드 라이브러리를 이용하여 VEGF의 활성 저해 정도를 조사한 결과이고,

도 3b는 첫 번째 2차 검색 결과에 기초하여 합성한 두 번째 2차 펩티드

라이브러리를 이용하여 VEGF의 활성 저해 정도를 조사한 결과이고,

도 4는 2차 검색에서 가장 효과적인 VEGF 저해활성을 보인 서열 혼합물을 C_{18} 역상 칼럼으로 분리한 후, 다시 각각의 분리된 펩티드 혼합물이 VEGF과 그 수용체간의 결합을 어느 정도 저해하는지를 검색한 결과이고,

도 5는 본 발명에서 분리한 12가지 펩티드의 VEGF과 그 수용체간의 결합 저해능을 조사한 결과이고,

도 6은 본 발명의 펩티드 중 가장 활성이 우수한 3개의 펩티드들이 VEGF 및 bFGF의 수용체간 결합에 미치는 영향을 나타낸 결과이고,

도 7은 서열 1, 서열 2 및 서열 3의 펩티드와 표지된 VEGF 간의 결합하는 정도가 과량의 각 펩티드에 의하여 저해되는 것을 보여주는 것이고,

도 8은 서열 1의 펩티드가 VEGF에 결합하는 정도가 과량의 VEGF 뿐만 아니라 서열 1, 서열 2 및 서열 3의 펩티드 각각에 의해 저해됨을 나타낸 결과이고,

도 9는 서열 1의 펩티드가 여러가지 이성체의 VEGF와 그 수용체간의 결합에 미치는 영향을 조사한 결과이고,

도 10a는 서열 1, 서열 2 및 서열 3의 펩티드가 VEGF이 유도하는 혈관벽 세포의 성장을 농도에 비례하게 저해하는 것을 나타낸 것이고,

도 10b는 과량의 펩티드를 처리하여 혈관벽 세포의 성장을 측정 한 결과 세포의 성장저해가 펩티드의 직접적인 독성에 의해 일어난 것이 아니라는 것을 확인한 것이고.

도 11은 서열 1의 펩티드가 VEGF에 의해 유도되는 토끼 각막에서의 신 혈관형성을 저해하는 것을 나타낸 결과이고,

도 12는 서열 1, 서열 2 및 서열 3의 펩티드가 VEGF을 분비하는 인간 암세포가 유도하는 신 혈관형성을 저해하는 것을 나타낸 사진이고,

도 13은 본 발명의 펩티드가 인간 근육종 암세포의 성장에는 직접적인 영향을 미치지 않음을 보여주는 것이고,

도 14는 서열 1의 펩티드가 인간의 직장암세포의 성장을 생쥐 내에서 효과적으로 저해함을 나타내는 결과이고,

도 15a는 서열 1의 펩티드가 쥐의 비장에 이식된 인간의 직장암 세포의 간 전이를 효과적으로 저해함을 전이된 2차 암종의 개수로써 조사한 것이고,

도 15b는 서열 1의 펩티드가 쥐의 비장에 이식된 인간의 직장암 세포의 간 전이를 효과적으로 저해함을 간의 무게로써 조사한 것이다.

발명의 상세한 설명

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명에서는 VEGF 활성을 저해하는 새로운 펩티드를 분리하기 위하여, 무작위 서열 혼합물(combinatorial library)로부터 작은 분자량의 약물선도 물질을 검색하는 방법을 이용하였다(Gho, Y. S. et al., Cancer Res., 57, 3733 (1997); Park, J. Y. et al., Endocrinology, 138, 617 (1997)).

우선 화학적으로 펩티드 무작위 서열 혼합물을 합성한다. 구체적으로

6개의 아미노산으로 연결된 펩티드를 합성하기 위해, 6개의 위치마다 19개의 아미노산이 각각 특정된 혼합물을 합성한다. 즉 특정된 위치에서 특정된 아미노산을 0라 표현하고 혼합물로 합성된 나머지 위치는 X로 표현하면, $0X_2X_3X_4X_5X_6$, $X_10X_3X_4X_5X_6$ 등이 되어 총 $114(6 \times 19)$ 혼합물을 합성하였다.

상기 펩티드 무작위 서열 혼합물로부터 VEGF가 혈관벽 세포에 존재하는 자신의 수용체에 결합하는 활성을 가장 효과적으로 저해하는 펩티드 서열을 분리한다. 본 발명에서는 배양된 혈관벽 세포에 방사능 이온으로 표지된 (labeled) VEGF 와 펩티드 무작위 서열 혼합물을 넣고 이들을 반응시키고 난 후, 결합하지 않은 VEGF는 제거하고 결합한 방사능의 양을 측정하여 혈관벽 세포에 존재하는 수용체에 결합한 VEGF의 양을 결정하였다. 그 결과 가장 최소의 농도로 VEGF가 자신의 수용체에 결합되는 활성을 저해한 펩티드 혼합물을 분리하였다.

상기와 같은 선별과정에 의하여 분리한 펩티드 혼합물은 각 위치마다 3-5개의 아미노산으로 특정되고 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

< 표 1 >

1(N)	2	3	4	5	6
K	K	K	R	K	R
R	R	R	K	R	K
G	H	H	H	W	H
A	T	T			F
H	W	W			L

상기 1차 선별과정의 결과를 토대로 하여 하기 표 2에 나타난 바와 같이 카르복시 말단의 두 위치를 선택된 아미노산으로 고정시키고 펩티드 서열의 나머지 위치는 1차 선별과정에서 선택된 아미노산들이 동일 비율로 합성되게 하였다.

< 표 2 >

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1-N	K, R, G, A, H 의 혼합물 K, R, H, T, W 의 혼합물 K, R, W, G, S 의 혼합물 R, K, H 의 혼합물														
2															
3															
4															
5	K	R	R	K	K	K	H	H	H	F	F	F	L	L	L
6-C	R	R	W	K	R	W	K	R	R	K	R	W	K	R	W

상기 표 2의 펩티드 혼합물로 다시 VEGF와 수용체의 결합을 저해하는 정도를 측정하고(도 3a 참조), 그 결과 분리된 펩티드의 서열을 결정한 결과 여섯 번째 위치에는 아르기닌과 히스티딘, 그리고 다섯 번째 위치에는 아르기닌과 라이신이 가장 효과적인 것으로 나타났다.

상기 두 번의 선별과정의 결과를 토대로 하여 하기 표 3에서와 같이 첫 번째, 네 번째, 그리고 여섯 번째 위치는 정해진 아미노산으로, 펩티드 서열의 나머지 세 위치는 상기 두 번의 선별과정에서 얻은 아미노산의 혼합물을 사용하여 펩티드 혼합물을 합성하였다.

< 표 3 >

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1-N	K	R	G	A	H	K	R	G	A	H	K	R	A	G	H
2	K, R, H, T, W 의 혼합물														
3	K, R, W, G, S 의 혼합물														
4	R	R	R	R	R	K	K	K	K	K	H	H	H	H	H
5	K, R 의 혼합물														
6-C	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

마찬가지로 VEGF의 활성을 가장 효과적으로 저해하는 펩티드를 분리한 결과, 첫 번째, 네 번째, 그리고 여섯 번째 위치 모두 아르기닌이 가장 효과적으로 VEGF과 그 수용체간의 결합을 저해하는 것으로 나타났다(도 3b 참조).

상기에서 분리된 펩티드 혼합물을 C₁₈ 역상 칼럼에서 다시 분리하여 VEGF와 수용체의 결합 저해능을 조사한 결과 첫 번째, 네 번째와 여섯 번째 위치에는 아르기닌이 가장 효과적이라는 사실을 확인하였으며, 두 번째 위치는 아르기닌, 라이신, 히스티딘이었으며, 세 번째 위치와 다섯 번째 위치는 아르기닌과 라이신임을 확인하였다(도 4 참조).

상기 아미노산으로 된 펩티드 서열을 하기 표 4에 나타내었다.

< 표 4 >

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1(R)-N	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
2(K, R, H)	K	R	H	K	R	H	K	R	H	K	R	H
3(K, R)	K	K	K	R	R	R	K	K	K	R	R	R
4(R)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
5(K, R)	K	K	K	K	K	K	R	R	R	R	R	R
6(R)-C	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
IC ₅₀ (μ M)	3.4	6.0	>20	8.5	4.5	>20	6.5	2.0	>20	7.8	3.8	>20

본 발명에서 분리한 상기 12개의 펩티드로 다시 한번 VEGF와 수용체의 결합 저해능을 조사한 결과, 서열 1의 펩티드($\text{NH}_2\text{-Arg-Arg-Lys-Arg-Arg-Arg-CONH}_2$), 서열 2의 펩티드($\text{NH}_2\text{-Arg-Lys-Lys-Arg-Lys-Arg-CONH}_2$) 그리고 서열 3의 펩티드($\text{NH}_2\text{-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-CONH}_2$)가 가장 강력한 VEGF 활성제해제임을 확인하였다.

상기한 펩티드가 VEGF과 그 수용체간의 결합을 저해하기 위해서는 여러 가지 가능한 기작이 있을 수 있으므로 구체적인 저해 메카니즘을 알아보기 위하여, 우선 검색된 펩티드들이 VEGF과 직접 결합하여 VEGF이 혈관벽 세포의 세포막 표면에 존재하는 수용체와의 결합을 저해하는지 확인하기 위하여, 펩티드와 표지된 VEGF와 표지되지 않은 VEGF의 경쟁적 결합정도를 측정하였다. 그 결과 표지된 VEGF가 펩티드에 결합하는 정도가 표지되지 않은 VEGF의 농도 및 첨가된 펩티드의 농도에 따라 감소하였으며 따라서 본 발명의 검색된 펩티드는 VEGF과 직접 결합한다는 것을 알 수 있었다. 또한, 한 펩티드와 표지된 VEGF간의 결합이 세 가지의 모든 펩티드에 의해 완전히 제거되는 것으로 보아, 상기의 서열 1, 서열 2 및 서열 3의 펩티드는 VEGF상에서 동일하거나 혹은 겹치는 결합부위를 가지는 것을 알 수 있었다(도 7 및 도 8 참조). 이들의 공통된 결합부위는 각각 분리 정제된 5가지의 VEGF 이성체와 그 수용체 간의 결합을 서열 3의 펩티드가 저해하는 정도를 측정하여 조사하였는데, VEGF_{121} 의 아미노 말단과 카르복시 말단이 결합부위에 있어 중요함을 알 수 있었다(도 9 참조).

본 발명의 펩티드가 VEGF에 의한 혈관벽 세포의 성장을 억제하는지 조

사하기 위하여, 검색된 펩티드와 VEGF의 존재하에서 혈관벽 세포의 DNA 합성 정도를 측정하였다. 그 결과 본 발명의 펩티드는 혈관벽 세포에 직접적인 독성 없이 VEGF에 의해 유도되는 혈관벽 세포의 DNA 합성을 농도에 비례하여 저해하는 것으로 나타나, 결국 VEGF에 의한 혈관벽 세포의 성장을 억제하는 활성이 있음을 확인하였다(도 10a 및 도 10b 참조).

또한 본 발명의 펩티드가 항-혈관형성 활성(anti-angiogenic activity)을 가지는지 조사하기 위하여, 달걀 CAM(chorioallantoic membrane)에 VEGF와 본 발명 펩티드를 처리한 결과 VEGF에 의해 유도되는 신 혈관형성을 본 발명의 펩티드가 저해하는 것을 확인하였고, 이와 더불어 토끼 각막을 이용한 신 혈관형성 생체 모델 실험을 실시한 결과, 본 발명의 펩티드와 VEGF를 동시에 처리한 실험군에서는 VEGF만을 처리한 실험군에서 관찰된 뚜렷한 신 혈관형성이 완전히 저해되는 것을 확인하였다(도 11 참조). 또한, 본 발명의 펩티드가 VEGF를 분비하는 암세포에 의해 유도되는 신 혈관형성을 억제하는지 조사하기 위하여 VEGF를 분비하는 근육종 암세포를 본 발명의 펩티드와 함께 달걀 CAM에 처리하여, 본 발명의 펩티드가 암세포에 의해 유도되는 신 혈관형성을 억제하는 것을 확인하였다(도 12 참조).

VEGF에 길항작용을 가지는 것으로 확인된 본 발명의 펩티드가 암세포의 성장을 직접적으로 억제하는지 알아보기 위하여, 우선 인간 근육종 암세포를 배양하여 본 발명의 펩티드를 처리한 다음 일정시간후 세포의 생존률을 측정하였다. 그 결과 본 발명의 펩티드가 직접적으로 암세포의 성장에 영향을 주는

것은 아님을 확인하였다(도 13 참조).

본 발명의 펩티드가 암의 성장과 전이 또한 저해할 수 있는지 확인하기 위하여 인간 직장암 세포를 전기 펩티드와 함께 쥐에 피하주사 하고, 종양의 크기를 측정한 결과, 인산염 완충액만을 주사한 대조군에 비해 종양의 부피를 현저하게 감소시킴을 확인할 수 있었다(도 14 참조). 또한 쥐의 비장에 이식된 암세포의 간 전이 억제 실험에서도, 본 발명의 펩티드를 처리하였을 때, 인산염 완충액만을 처리한 대조군에 비해 전이암 덩어리의 개수 및 간의 무게에 있어 우수한 저해능을 보였다(도 15a 및 도 15b 참조). 상기한 결과로부터 본 발명의 펩티드는 VEGF의 신호 전달을 막음으로써 악성종양의 성장과 전이를 저해할 수 있음을 알 수 있었다.

상기와 같은 여러 가지 실험을 통하여 본 발명의 펩티드는 암세포의 성장에는 직접적인 영향을 주는 것은 아니고, 암세포에 의해 유도되는 혈관형성을 특이적으로 저해하며 이는 본 발명의 펩티드가 암세포에 의해 분비되는 VEGF이 혈관벽 세포의 세포막 표면에 존재하는 수용체와 결합하는 것을 저해하는 것에 의한 결과라는 사실이 확인되었다.

따라서 본 발명의 펩티드는 VEGF가 그 수용체에 결합하는 것을 저해하는 효과가 우수하므로 효과적인 항암제 또는 당뇨병 실명증, 류마티스 관절염 등의 신 혈관형성과 관련된 질병의 치료제 등으로 사용될 수 있다.

상기의 상세한 설명은 실시예에서 언급된다.

이하 실시예로써 본 발명을 기술하되, 하기 실시예가 본 발명의 내용을 제한하는 것은 아니다.

<실시예 1> ^{125}I 로 표지된 VEGF의 특성 규명

^{125}I 로 표지된 VEGF₁₆₅를 실험에 사용하기 위해 먼저 이 표지된 단백질이 생체 내에 존재하는 단백질과 동일한 활성을 가지는지 조사하였다.

우선, 인간의 태줄에서 유래한 혈관벽 세포(HUVE cell, Clonetics)를 배양 용기(gelatin-coated 100 mm dish, Falcon)에 넣고 혈관벽 세포용 배지(Medium 199 + 20% BCS, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of heparin, 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of endothelial cell growth supplement, 5 ng/ml of basic Fibroblast Growth Factor)로 37°C 동물 세포용 이산화탄소 배양기에서 배양하였다. 세포가 가득 자라면 트립신/EDTA 용액을 처리하여 원심분리한 후 혈관벽 세포용 배지로 다시 섞은 다음 세포(5×10^4 cells/well, Clonetics)를 배양용기(24 well, Costar Co.)에 넣고 하루 동안 키운 후 ^{125}I 로 표지된 VEGF₁₆₅ 0.2 ng이 들어 있는 결합 용액(Medium 199/25 mM HEPES (pH 7.4)/ 0.1% bovine serum albumin)에 넣고 4°C에서 3시간 동안 결합시키고 난 후, 결합하지 않은 표지된 VEGF를 제거하기 위해 위에서 사용한 배지와 0.1%의 알부민이 든 인산염 완충용액으로 각각 2 번과 1번씩 씻어 주었다. 그 후, 혈관벽 세포에 존재하는 수용체에 결합한 표지된 VEGF의 양을 결정하기 위해 이 배양용기에 0.5 ml의 용해 용액(20 mM Tris-HCl (pH 7.4)/1% Triton X-100)을 상온에서 20분간 처리한 후 용해된 세포 혼합물을 γ

-카운터(Counter)를 이용하여 결합한 방사능의 양을 측정하였다. 비특이적 결합(non-specific binding)은 표지된 VEGF과 표지되지 않은 VEGF의 물비가 1 : 100이 되게 같이 배양하여 결정하였으며, 이것을 음의 대조군으로 사용하였다.

도 1a 및 도 1b에서 나타난 결과에 의하면 표지된 VEGF(1 ng/ml)과 인간의 태줄에서 유래한 혈관벽 세포(5×10^4 cells/well)의 세포막 표면에 존재하는 VEGF수용체간의 결합이 결합시간과 표지된 VEGF 농도에 의존적이었으므로 이는 둘간의 상호작용이 특이적이라는 것을 보여주는 것이다.

도 1b에서 얻은 결과를 스캐차드(Scatchard) 분석법을 통해 혈관벽 세포 표면에 두 종류의 수용체가 존재함을 확인하였다(도 1c). 이 두가지 수용체 중의 하나는 결합력(KD)이 3 pM이며, 한 세포당 약 2000개가 존재하며, 다른 하나는 결합력(KD)이 50 pM이며 한 세포당 약 6000개가 존재하는 것으로 나타났다. 이상의 결과가 기존의 여러 연구들에 의해 보고된 바와 일치함을 확인하였다(Maciag, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 76, 5674 (1979); Myoken, Y. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88, 5819 (1991); Gengrinovitch, S. et al., J. Biol. Chem., 270, 15059 (1996); Bikfalvi, A. et al., J. Cell Physiol. 149, 50 (1991)).

<실시에 2> 펩티드 무작위 서열 혼합물에서 VEGF 길항작용 펩티드 서열 검색

(단계 1) 펩티드 무작위 서열 혼합물의 제조

펩티드 무작위 서열 혼합물은 다음과 같이 합성하였다(Pinilla, C. et al., Bio Techniques, 13, 901, (1992)).

6개의 아미노산으로 연결된 펩티드를 합성할 때 특정 위치를 이미 아는 아미노산으로 정하고 나머지 5개의 위치는 씨스틴을 제외한 19개의 아미노산의 혼합물로 연결하였다. 즉, 아는 아미노산으로 정해진 위치를 0라 표현하고 혼합물로 합성된 나머지 위치는 X로 표현하면, $0X_2X_3X_4X_5X_6$, $X_10X_3X_4X_5X_6$ 등이 되어 6개의 위치마다 19개의 이미 아는 아미노산으로 정해진 혼합물을 만들었다. 따라서 총 $114(6 \times 19)$ 혼합물이 만들어졌다.

(단계 2) 1차 펩티드 서열 검색

펩티드 무작위 서열 혼합물로부터 VEGF과 그 수용체가 결합하는 펩티드를 선별하기 위해 다음과 같은 실험을 실시하였다.

인간 태줄에서 유래한 혈관벽 세포(5×10^4 cells/well, Clonetics)를 배양용기(24 well Costar Co.)에 넣고 하루동안 키운 후, ^{125}I 로 표지된 VEGF 0.2 ng과 여러 농도의 펩티드나 펩티드 서열 혼합물이 들어 있는 배지(Medium 199/25 mM HEPES(pH 7.4)/0.1% bovine serum albumin)에 넣고 4°C에서 3시간동안 결합시키고 난 후, 결합하지 않은 표지된 VEGF을 제거하기 위해 위에서 사용한 배지와 0.1%의 알부민이 든 인산염 완충용액으로 각각 2번과 1번씩 씻어 주었다. 그 후, 혈관벽 세포에 존재하는 수용체에 결합한 표지된 VEGF의 양을 결정하기 위해 이 배양용기에 0.5 ml의 용해 용액(20 mM Tris-HCl(pH 7.4)/1% Triton X-100)을 상온에서 20분간 처리한 후 용해된 세포 혼합물을 γ -카운터

를 이용하여 결합한 방사능의 양을 측정하였다.

도 2는 0.33 nM/펩티드 서열의 농도로 펩티드 무작위 서열 혼합물을 사용하여 실시한 1차 선별과정의 결과이다. 이 결과에 기초하여 상기 표 1에 표시된 바와 같이 각 위치마다 3내지 5개의 아미노산을 선택하였으며, 펩티드 서열의 모든 위치에서 라이신과 아르기닌이 혈관벽 세포 성장 호르몬의 활성화에 대한 길항능이 가장 탁월한 것으로 나타났다.

(단계 3) 2차 펩티드 서열 검색

1차 선별과정의 결과를 토대로 하여 두 번의 2차 혼합물을 상기 표 2와 같이 합성하여 혈관벽 세포 성장 호르몬과 그 수용체간의 결합을 저해하는 정도를 조사하여 그 결과를 도 3a 및 도 3b에 나타내었다.

상기 표 2에 나타난 바와 같이, 첫 번째 2차 라이브러리의 합성을 위해 카르복시 말단의 두 위치를 선택된 아미노산으로 고정시키고 펩티드 서열의 나머지 위치는 2차 선별과정에서 선택된 아미노산들이 동일 비율로 합성되게 하였다. 이 첫 번째 2차 라이브러리에는 15개의 펩티드 혼합물이 있으며, 각 혼합물은 375가지의 펩티드 서열을 가진 혼합물로 구성되어 있다.

1차 검색과정과 동일한 방법으로 이 첫 번째 2차 라이브러리의 다양한 농도(0.01, 0.05, 0.1, 1 μ M/sequence)에서 VEGF의 활성화 저해 정도를 조사하였으며, 그 중 0.1 μ M/서열의 결과를 도 3a에 나타내었다. VEGF의 활성을 가장 효과적으로 저해하는 펩티드의 서열은 여섯 번째 위치에는 아르기닌과 히스티딘, 그리고 다섯 번째 위치에는 아르기닌과 라이신이 가장 효과적인 것으로

나타났다.

상기 두 번의 선별과정의 결과를 토대로 하여 두 번째 2차 라이브러리
를 만들기 위해, 아미노 말단에서부터 첫 번째, 네 번째, 그리고 여섯 번째 위
치는 정해진 아미노산으로, 펩티드 서열의 나머지 세 위치는 상기 두 번의 선
별과정에서 얻은 아미노산의 혼합물을 사용하였다(표 3 참조).

두 번째 2차 라이브러리도 역시 15개의 펩티드 혼합물을 가지고 있으
며, 각 혼합물은 50가지의 펩티드 서열로 구성되어 있다. 각 혼합물의 활성을
여러 농도(0.1, 0.25, 1 μ M/sequence)로 검색하였으며, 그중 0.25 μ M/서열의
결과를 도 3b에 나타내었다.

그 결과 첫 번째, 네 번째, 그리고 여섯 번째 위치 모두 아르기닌이 가
장 효과적으로 VEGF와 그 수용체간의 결합을 저해하는 것을 알 수 있었다.

(단계 4) 펩티드 서열의 분리

두 번째 2차 라이브러리에서 선별된 가장 효과적인 펩티드 혼합물을 C₁₈
역상 칼럼에서 서로 다른 머무름 시간을 가지고 분리되는 6개의 혼합물로 다시
분리하였으며, 다시 이 여섯 가지의 혼합물의 다양한 농도(0.5, 1, 2, 5, 10,
25 μ M/peptide)에서 VEGF와 그 수용체간의 결합에 미치는 영향을 조사하였다
(도 4).

그 결과 1번 혼합물이 가장 높은 활성을 보였으며, 이 혼합물이 UV₂₈₀에
서 흡광도를 보이지 않아 트립토판이 포함되어 있지 않은 것을 확인하였고, 아
미노산 조성 분석에서 아르기닌, 라이신과 히스티딘이 존재함을 확인하였다.

지금까지의 여러번의 검색결과 VEGF와 그 수용체간의 결합을 저해할 수 있는 6개의 아미노산으로 구성된 펩티드에서 첫 번째, 네 번째와 여섯 번째 위치에는 아르기닌이 가장 효과적이라는 사실을 확인하였으며, 두 번째 위치(아르기닌, 라이신과 히스티딘), 세 번째 위치(라이신과 아르기닌) 그리고 다섯 번째 위치(아르기닌과 라이신)들은 2 내지 3개의 아미노산들로 범위를 좁힐 수 있었다.

상기 세 위치가 고정된 아미노산들의 조합인 12개의 펩티드를 상기 표 4와 같이 합성하여, C₁₈ 역상 칼럼으로 각 펩티드를 순수 분리하였다.

(단계 5) 3차 펩티드 서열 검색

아미노산 조성 분석을 통해 각 펩티드의 서열을 간접적으로 확인하고, 농도를 결정하고 난 후, 이 12개의 펩티드들의 VEGF에 대한 길항작용을 다양한 농도(1, 4, 10, 20 μ M/sequence)에서 검정하였다(도 5).

그 결과 서열 1, 서열 2 및 서열 3의 3개의 펩티드들이 VEGF이 그 수용체에 결합하는 것을 가장 효과적으로 저해함을 확인하였고, 그 각각의 IC₅₀ 값은 2, 3.4와 3.8 μ M/서열이었다.

또한, 도 6의 결과에서 보듯이, 라이신으로만 이루어진 높은 농도(10 μ M)의 대조군 펩티드가 표지된 VEGF와 그 수용체간의 결합을 저해하지 않는 것으로 볼 때, 전기 결과는 양의 전하를 가진 아미노산 때문이 아니라 특이적 아미노산 서열 때문임을 확인할 수 있었으며, 상기의 세 가지 펩티드가 모두 유사한 신 혈관형성 유도 인자인 염기성 섬유아세포 성장호르몬(bFGF)과 그 수

용체간의 결합을 저해하지는 않는 것으로 보아 상기의 세 펩티드가 VEGF에만 특이적임을 알 수 있었다..

<실시에 3> 펩티드 무작위 서열 혼합물로부터 검색된 펩티드들의 특성 연구

VEGF과 그 수용체간의 결합을 저해하기 위해서는 여러 가지 가능한 기작이 있을 수 있다. 예를 들면, 직접 VEGF이나 그 수용체중 어느 하나와 결합하여 둘간의 상호작용을 막을 수 있다.

검색된 펩티드들이 VEGF과 직접 결합하여 VEGF이 혈관벽 세포의 세포막 표면에 존재하는 수용체와의 결합을 저해한다는 것을 증명하기 위해 다음과 같은 실험을 실시하였다. 상기 실시예 2의 단계 5에서 검색하고 합성 정제한 여섯 개의 아미노산으로 구성된 각 펩티드를 20% 초산 용액에 녹인 후 공기 중에서 말리는 방법으로 96 웰 엘리자 용기에 고정(100 ng/well)시키고, 0.1%의 알부민이 든 인산염 완충액으로 상온에서 3분간 3회 처리하고 난 후, 앞서 사용한 인산염 완충용액에 ^{125}I 로 표지된 VEGF(0.2 ng/well)을 넣어 고정된 펩티드와 37°C에서 1시간 동안 결합시켰다. 결합되지 않은 표지된 VEGF을 앞서 사용한 인산염 완충 용액으로 상온에서 3분간 4회 씻어낸 다음 γ -카운터로 결합한 방사능의 양을 측정하였다. 비특이적 결합(non-specific binding)은 표지된 VEGF과 표지되지 않은 VEGF의 몰비, 혹은 고정된 펩티드와 결합용액에 넣어준 고정되지 않은 펩티드의 몰비가 1 : 100이 되게 같이 배양하여 결정하였으며,

이것을 음의 대조군으로 사용하였다.

그 결과 도 7에 나타난 것처럼, 표지된 VEGF은 고정된 펩티드와 직접 결합하였으며, 이 상호작용은 과량의 표지되지 않은 VEGF이나 용액상태의 펩티드를 결합용액에 첨가함으로써 완전히 제거됨을 알 수 있었다. VEGF과 각 펩티드간의 결합력(KD)은 IC_{50} 값을 이용한 하기 식을 이용하여 구하였다(De Blasi, A. et al., Trends Pharmacol. Sci., 10, 227 (1989)).

$$KD = IC_{50} - [\text{표지되지 않은 경쟁제}]$$

상기 식을 이용하여 결정된 결합력(KD)은 서열 1, 서열 2, 서열 3의 펩티드에 대해서 각각 5, 2 그리고 $22 \mu M$ 이었다. 이 결과에 의하면 펩티드 무작위 서열 혼합물로부터 검색된 3가지 펩티드들은 모두 VEGF과 직접적으로 또 특이적으로 결합함을 알 수 있다. 또한, 도 8에서 보듯이, 한 펩티드와 표지된 VEGF 간의 결합이 세 가지의 모든 펩티드에 의해 완전히 제거되는 것으로 보아, 상기의 서열 1, 서열 2 및 서열 3의 펩티드는 VEGF상에서 동일하거나 혹은 겹치는 결합부위를 가지는 것을 알 수 있다.

상기한 바와 같이, 전기 세 가지 펩티드가 VEGF의 공통된 부위와 결합하며, 이들 중 서열 1(RRKRRR)이 가장 효과적으로 VEGF의 결합을 저해하였기 때문에 서열 1의 펩티드를 이용하여 VEGF 상의 공통된 결합부위를 조사하였다. 먼저, 적절한 프라이머를 합성하여 인간의 간 cDNA 라이브러리(Clontech)를 주형으로 PCR을 통해 다양한 형태의 VEGF₁₆₅, VEGF₁₂₁, VEGF₈₋₁₂ 및 VEGF₈₋₁₀₉의 cDNA를 증폭한 다음, 이들을 대장균 발현 플라스미드인 pRSET A(Invitrogen)에 재

조합하고, DNA 염기서열을 확인하였다. 5 가지의 VEGF를 가진 각각의 pRSET A 플라스미드를 T7 중합효소를 가지고 있는 발현균주(BL21(DE3)pLysS)에 형질 전환시킨 후, 이 형질전환 대장균을 배양하여 다양한 형태의 VEGF를 봉입체(inclusion body)의 형태로 얻어 기존에 보고된 것과 동일한 방법을 이용하여 90% 이상의 순도로 분리정제 하였다(Siemeister, G. et al., Biochem. Biophysics. Res. Commun., 222, 249 (1996)). 분리 정제된 각각의 VEGF는 단백질 정량시약(protein assay reagent, Bio-Rad)을 이용하여 정량하였으며, 이들은 모두 VEGF 수용체와 결합하고 HUVE 세포주에 성장호르몬 활성을 나타내었다. ^{125}I (0.5 mCi/5 μg 의 각 단백질)와 IODO-Bead(Pierce)를 이용하여 각각의 분리 정제된 VEGF를 표지하였으며, 각각의 표지된 단백질은 쥐의 VEGF 단일항체(monoclonal anti-VEGF antibody, R&D systems)를 이용한 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 방법으로 정량하여 사용하였다.

실시에 2에서 제시된 VEGF에 대한 각 펩티드의 길항능을 조사하는 방법을 이용한 실험을 수행한 결과, 서열 1(RRKRRR)의 펩티드는 표지된 VEGF₁₆₅ 뿐만 아니라 헤파린 결합부위(heparin-binding domain)가 없는 표지된 VEGF₁₂₁과 그 수용체간의 결합도 저해하는 것을 볼 때, VEGF의 헤파린 결합부위는 전기 펩티드와 VEGF와의 결합과는 무관함을 알 수 있었다. 그리고, 나머지 VEGF 이성체인 VEGF₈₋₁₂₁, VEGF₁₀₉ 및 VEGF₈₋₁₀₉의 수용체와의 결합을 서열 3의 펩티드가 저해하지 못하는 것으로 보아, 전기 펩티드와 VEGF와의 결합에 VEGF₁₂₁의 아미노 말단 및 카르복시 말단이 중요함을 알 수 있었다(도 9).

<실시예 4> 3차 검색에 의한 펩티드들이 가지는 VEGF에 의한 혈관벽 세포 성장의 억제능력 검증

펩티드 무작위 서열 혼합물로부터 검색된 서열 1, 서열 2 및 서열 3의 펩티드들이 인간의 태줄에서 유래한 혈관벽 세포에서 VEGF이 유도하는 DNA 합성을 억제하는지를 알아보기 위해 다음과 같은 실험을 실시하였다.

젤라틴이 고정된 배양용기(48 well, Nunc)에 혈관벽 세포(10^4 cells/well)를 넣어 37°C 에서 하루간 배양한 다음 혈청이 들어있지 않은 배지 (serum-free medium 199)로 3회 씻어준 뒤 VEGF(10 ng/ml , R&D System))과 다양한 농도의 검색된 펩티드가 들어있는 배양용액을 가한 후 37°C 에서 배양하였다. 24시간 후 삼중수소로 표지된 티미딘([methyl- ^3H]thymidine, $0.5\text{ }\mu\text{Ci/well}$)을 가한 후 다시 하루간 배양하였다. 이를 0.1%의 알부민이 든 인산염 완충액으로 씻은 후 0.4 N NaOH 로 상온에서 20분간 세포를 용해시키고 2 N HCl 로 중화시킨 다음 DNA 합성에 이용된 방사능의 양을 액체섬광계수기(liquid scintillation counter)로 측정하였다. 검색된 펩티드의 독성을 조사하기 위해 과량의 각 펩티드($100\text{ }\mu\text{M}$)를 VEGF이 없는 상태에서 위와 동일한 과정으로 실험을 실시하였다.

그 결과 도 10a에서 알 수 있는 것처럼 검색된 펩티드는 모두 VEGF에 의해 유도되는 혈관벽 세포의 DNA 합성을 농도에 비례하게 저해하고 IC_{50} 값은 $10 \sim 20\text{ }\mu\text{M}$ 이었다.

또한, 과량의 펩티드($100\text{ }\mu\text{M}$)를 처리해 동일한 실험을 했을 때 혈관벽

세포의 성장에 영향이 없는 것을 확인함으로써 이런 DNA 합성 저해 현상이 혈관벽 세포에 대한 검색된 펩티드의 직접적인 독성에 의해 일어난 것이 아니라 는 것도 알 수 있었다(도 10b).

이상의 실험결과에 의거하여 본 발명자들은 3가지의 검색된 펩티드가 VEGF와 그 수용체간의 결합을 저해함으로써 VEGF에 의한 내피세포의 성장 유도를 특이적으로 저해하는 활성을 가짐을 확인할 수 있었다.

<실시예 5> 검색된 펩티드들의 VEGF이나 이를 분비하는 인간 암세포에 의해 유도되는 신 혈관형성 억제능력 검증

본 발명의 펩티드의 항-혈관형성 활성(anti-angiogenic activity)을 검증하기 위하여, 달걀 CAM(chorioallantoic membrane)을 이용해서 이들이 VEGF에 의해 유도되는 신 혈관형성을 억제하는지 여부를 조사하는 실험을 실시하였다.

유정란(폴무원)을 90%의 습도가 유지되는 37℃ 배양기에 넣고 배양시켰다. 3일 후에 2 ml 정도의 알부민을 제거하고 4일 후에 달걀 껍질의 일부를 제거해 2 cm × 2 cm 정도의 창을 만들었다.

VEGF(10 ng/egg, R&D System)과 다양한 양의 펩티드나 다른 시료를 섞은 후에 3 μ l를 1/4 조각의 더마녹스 커버슬립(Thermanox coverslip, Nunc)에 점적하여 말린 후 상기 9일배 달걀의 CAM에 얹었다.

이틀 후에 점적된 샘플로 인해 유도되는 혈관이 있는지 여부를 해부 현

미경하에서 두 사람이 각각 독립적으로 결정하였다. 실험은 각각의 샘플당 10여개의 달걀을 이용해 3회 이상 반복 실시하여 그 결과를 하기 표 5에 나타내었다.

< 표 5 >

시료	양성 반응 달걀 수 /총 달걀 수	양성 반응(%)	P ^a
물	3/28	10.8(1.4) ^b	
VEGF(10 ng)	9/27	33.6(3.8)	0.004
VEGF + RRKRRR(1 µg)	4/26	15.6(5.1)	0.245
VEGF + RKKRKR (1 µg)	4/26	15.6(4.5)	0.271
VEGF + RRRRRR (1 µg)	4/26	15.6(5.1)	0.245
VEGF + KKKKKK (1 µg)	8/25	32.6(12.2)	0.038
VEGF + 프로타민(50 µg)	5/26	18.8(4.1)	0.128

^a는 물만을 사용했을 때 얻은 값과 각 샘플의 값을 학생-t 검정법을 이용해 결정한 값으로, P<0.05인 경우, 그 실험결과는 물에 대한 결과와 통계적으로 상당히 다름을 의미한다

^b는 표준 편차를 의미한다.

상기 표에서 알 수 있듯이, 전기 생체 실험모델에서 VEGF는 혈관 신생을 약 33.6% 유도하는 활성을 보여주었다. 이러한 신 혈관형성은 검색된 펩티드(1 µg/egg) 또는 항-혈관형성 인자(anti-angiogenic factor)로 알려진 프로타민(protamine, 50 µg/egg)을 VEGF와 동시에 처리하였을 때, 각각 약 15.6%, 18.8% 정도 효과적으로 저해되었다. 하지만, 본 발명에서 검색된 펩티드와 비

슷한 성질을 가지고 있지만 검색에서 선택되지 않은 대조군 펩티드(KKKKKK)는 검색된 펩티드가 가지는 항-혈관형성 활성을 보이지 않았다(약 32.6%).

위의 달걀 CAM을 이용한 실험결과를 재확인하기 위해, 토끼 각막을 이용한 신 혈관형성 생체 모델 실험을 실시하였다. 뉴질랜드산 웅성 흰 토끼(3 kg, SLC, Japan)를 마취(intramuscular ketamine anesthesia, 44 mg/kg)시킨 후 수술용 칼(Bard-Parker #11)을 이용하여 각막(corneal dome)을 3 mm 절개하였다. 아미노산 서열 EEFDDA 또는 서열 1(RRKRRR)의 펩티드 1 μ g을 VEGF(10 ng, R&D system)와 섞은 용액 또는 VEGF(10 ng, R&D system)만을 점적하여 무균상태에서 말린 Thermanox coverslip(Nunc)을 절개부위에 넣고, 자연 치유되게 하였다. 신 혈관형성이 뚜렷이 관찰되는 16일 후에 각막에 새로이 생성된 혈관의 사진을 찍었는데(Nikon, FS-2, Japan), 각 실험군마다 6마리의 토끼가 이용되었으며, 실험군 내의 모든 동물에서 유사한 결과가 관찰되었다. 도 11에서 보듯이, 대조군으로 사용된 EEFDDA 서열의 펩티드는 VEGF에 의해 유도되는 토끼 각막에서의 신 혈관형성에 아무런 영향도 주지 못한 반면(도 11의 C), 서열 1의 펩티드(RRKRRR)와 VEGF를 동시에 처리한 실험군(도 11의 B)에서는 VEGF만을 처리한 실험군(도 11의 A)에서 관찰된 뚜렷한 신 혈관형성이 완전히 저해되었다.

상기 두가지 실험과 도 10b의 결과를 종합하면, 검색된 펩티드는 혈관벽 세포의 성장에는 직접적인 영향을 주지 않고, 넣어준 VEGF이 혈관벽 세포에 존재하는 그 수용체와 결합하는 것을 막음으로써 VEGF이 유도하는 신 혈관형성

을 생체내에서(in vivo) 억제할 수 있음을 알 수 있다.

검색된 펩티드가 VEGF을 분비하는 암세포에 의해 유도되는 신 혈관형성을 억제함을 달걀 CAM을 이용한 동일한 실험을 통해 확인하였다. 앞서 행한 실험과 같은 방법으로 수정란을 구입해 알부민을 제거하고 창을 만들었다. 10^5 개의 인간 근육종 암세포(HT1080, human fibrosarcoma)와 $7.5 \mu\text{g}$ 의 Type I 콜라젠(Rat tail, Beckton Dickinson, USA)을 $5 \mu\text{l}$ 의 부피에 섞어 이를 1/4 조각의 더마녹스 커버슬립에 점적해 상온에서 콜라젠 스폰지를 만들었다. 이 콜라젠 스폰지를 10일 배의 달걀 CAM 위에 얹은 후 3일간 37°C 에서 배양하여 암세포에 의해 유도되는 혈관을 상기와 같은 방법으로 확인하고 사진을 찍었다 (표 6 및 도 12 참조).

< 표 6 >

시료	양성 반응 달걀 수 /총 달걀 수	양성 반응(%)	P ^a
세포 없음	5/27	18.5(2.1)	
암세포만	18/24	76.0(8.5)	0.011
암세포 + RRKRRR ($0.1 \mu\text{g}$)	8/22	36.0(8.5)	0.160
암세포 + RKKRKR ($0.1 \mu\text{g}$)	10/23	43.0(9.9)	0.141
암세포 + RRRRRR ($0.1 \mu\text{g}$)	10/24	41.0(7.1)	0.098
암세포 + KKKKKK ($0.1 \mu\text{g}$)	14/22	59.0(1.4)	0.002

그 결과 VEGF을 분비하는 인간 근육종 암세포도 달걀 CAM에서 배양하였을 때 전형적인 "수레바퀴(spokewheel)" 구조를 보였으며(10^5 cells/egg, 76%), 검색된 펩티드(100 ng/egg , 36 ~ 43%)를 암세포와 동시에 처리하였을 때 신 혈관형성이 저해되었다. 하지만, 위에서 사용한 대조군 펩티드는 암세

포와 동시에 처리하였을 때 통계적으로 유의미한 정도의 저해활성을 보이지 않았다(100 ng/well, 59%).

<실시예 6> 검색된 펩티드가 인간 근육종 암세포의 성장에 미치는 직접적 영향 검증

VEGF의 길항작용 펩티드들이 인간 근육종 암세포의 성장에 직접적인 영향이 있는지 여부를 다음과 같은 실험을 통해 알아보았다. 인간 근육종 암세포(5×10^3 cells/well)를 배양용기(96 well, Nunc)에 넣고 하루간 배양한 후 여러 농도의 검색된 펩티드가 들어 있는 배지(DMEM)를 가하여 배양하였다. 3일 후에 살아 있는 세포의 수를 20 μ l 테트라졸리움 염색약(Cell Titer 96 Non-Radioactive Proliferation assay kit, Promega)을 가하여 37°C에서 4시간 배양한 후, 살아 있는 세포에 의해 생성된 포마잔 양을 0.2 ml의 용해 용액을 넣어 용해시켜 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때, 용해된 포마잔에 의한 흡광도는 살아 있는 세포 수에 비례한다.

그 결과 도 13에 나타난 바와 같이 검색된 펩티드 모두는 10^{-4} M의 농도에서도 인간 근육종 암세포의 성장에 영향을 주지 않았다.

본 실험과 상기 실시예 5에서 관찰된 결과들은 검색된 펩티드가 인간 근육종 암세포의 성장에는 직접적인 영향을 주지 않지만 인간 근육종 암세포에 의해 유도되는 신 혈관형성을 특이적으로 저해함을 보여주고 있으며, 이는 검색된 펩티드가 인간 근육종 암세포에 의해 분비되는 VEGF이 혈관벽 세포의 세

포막 표면에 존재하는 수용체와 결합하는 것을 저해함으로써 인간 근육종 암세포에 의해 유도되는 신 혈관형성을 억제하고 있음을 보여주고 있다.

<실시에 7> 검색된 펩티드가 인간 직장 암세포(HM7)의 성장과 전이에 미치는 영향 검토

혈관신생 능력을 획득하는 것이 암의 진행에 결정적인 단계이며, 암조직의 계속된 성장을 위해 필수적이라는 사실이 보고되었고(Hanahan, D. et al., Cell, 86, 353 (1996); Skobe, M., et al., Nature Med., 3, 1222 (1997)), 상기한 실험에서 검색된 펩티드가 생체내에서 신 혈관형성을 효과적으로 저해할 수 있음이 확인되었으므로, 전기 펩티드가 암의 성장과 전이 또한 저해할 수 있는지 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다. 인간 직장암 세포(HM7 human colon carcinoma cell line, 5×10^6 cells)를 아미노산 서열 EEFDDA 또는 서열 1(RRKRRR)의 펩티드($0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$)와 함께 무혈장 배지(serum-free DMEM)에 섞은 다음 4주된 웅성 쥐(athymic nude mice, BALB/c/nu/nu, Charles River, Japan)에 피하주사 하고, 다음날부터는 15일간 인산염 완충용액에 녹인 각 펩티드($0.5 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}/\text{day}$)를 피하주사 하였다. 종양의 크기는 정기적으로 측정되었으며, 종양의 부피는 다음 식을 이용하여 계산되었다.

$$\text{종양 크기} = 0.5 \times (\text{직경})^2 \times \text{길이}$$

비장에 이식된 암세포의 간 전이 실험을 위해, 마취(diethyl ether)한

후 개복한 뒤(flank incision) 4주된 웅성 쥐(athymic nude mice, BALB/c/nu/nu, Charles River, Japan)의 비장에 인간 직장암 세포(HM7, 10^6 cells)와 아미노산 서열 EEFDAA, KKKKKK, 또는 서열 1(RRKRRR)의 펩티드($0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$)의 혼합물 $100 \mu\text{l}$ 를 천천히 주사한 뒤, 상기한 바와 동일한 방법으로 각 펩티드를 3주간 피하 주사하고, 4주후부터 각 쥐로부터 간을 적출하여 무게와 작은 전이 암 덩어리(metastatic nodule)의 개수를 조사하였다. 각 실험군은 6 내지 7 마리의 쥐로 구성되었으며, 학생 t-검증법에서 P 값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의미한 것으로 간주하였다(도 14, 도 15a 및 15b). 그리고, 테트라졸리움 염색약(Cell Titer 96 Non-radioactive Proliferation Assay Kit, Promega)을 이용한 실험에서 각 펩티드가 암세포(5×10^3 cells/well)의 성장에 영향이 없는 것이 확인되었기 때문에, 처리된 펩티드의 독성에 의한 암 세포의 상장과 전이의 저해 가능성은 배제할 수 있었다.

15 일간 피하주사한 결과, 대조군인 서열 EEFDAA 펩티드는 전혀 효과를 보이지 않는 반면, 서열 1의 RRKRRR 펩티드는 인산염 완충액만을 주사한 대조군에 비해 종양의 부피를 약 28%로 감소시킴을 확인할 수 있었다(도 14). 또한, 간으로의 암 전이 억제 실험에서도 서열 EEFDAA 펩티드는 전혀 효과를 보이지 않고, 서열 KKKKKK 펩티드는 약한 저해능(대조군의 약 80%)을 보인 반면, 서열 1의 RRKRRR 펩티드는 인산염 완충액만을 주사한 대조군에 비해 전이암 덩어리의 개수 및 간의 무게에 있어 각각 16% 및 33%로서 우수한 저해능을 보였다(도 15a 및 15b). 상기한 결과로부터 검색된 펩티드는 VEGF의 신호 전달을

막음으로써 악성종양의 성장과 전이를 저해할 수 있음을 알 수 있다.

상기 서열 1, 서열 2, 서열 3 펩티드는 임상투여시에 비경구 주사 투여가 바람직하며, 유효용량은 $0.1 \sim 100 \mu\text{g/kg}$ 이고, 바람직하기로는 $0.5 \sim 10 \mu\text{g/kg}$ 이며, 하루 1 회 약 2 ~ 3주간 투여될 수 있다.

한편, 상기 서열 1, 서열 2, 서열 3 펩티드의 급성 독성을 알아보기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

<실시에 8> 랫트에 대한 비경구투여 급성 독성실험

서열 1, 서열 2, 서열 3 펩티드의 급성 독성을 알아보기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다. 6주령의 특정병원부재(SPF) SD계 랫트를 사용하여 급성독성실험을 실시하였다. 군당 2 마리씩의 동물에 서열 1, 서열 2, 서열 3의 펩티드 (1 mg/kg)을 1 ml의 인산 완충액에 녹여 근육내 주사하였다. 시험물질 투여후 동물의 폐사여부, 임상증상, 체중변화를 관찰하고 혈액학적 검사와 혈액생화학적 검사를 실시하였으며, 부검하여 육안으로 복강장기와 흉강장기의 이상여부를 관찰하였다. 시험결과, 시험물질을 투여한 모든 동물에서 특기할 만한 임상증상이나 폐사된 동물은 없었으며, 체중변화, 혈액검사, 혈액생화학 검사, 부검소견 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다. 이상의 결과 실험된 모든 서열 1, 서열 2, 서열 3은 in vitro에서 실시된 세포 독성 실험(혈관벽

세포, 인간 근육종 암세포, 인간 직장 암세포)에서 세포 독성이 관찰되지 않았고, 랫트에서 주사 투여 시 1 mg/kg까지 독성변화를 나타내지 않으며 주사 투여 최소치사량 (LD₅₀)은 1 mg/kg 이상인 안전한 물질로 판단되었다.

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 펩티드는 VEGF과 혈관벽 세포에 존재하는 그 수용체간의 결합을 저해하고, VEGF의 활성을 저해하며, VEGF과 그 호르몬을 분비하는 암세포에 의해 유도되는 신 혈관형성을 저해하여 암세포의 성장과 전이에 우수한 저해능을 보인다. 따라서, 본 발명의 펩티드는 당뇨병 실명증과 류마티스 관절염을 포함한 신 혈관형성과 관련된 질병의 치료제 및 암의 성장과 전이를 막을 수 있는 항암제로 유용하게 이용될 수 있고, 또한 본 발명의 펩티드를 이용한 암 치료방법은 암세포가 아닌 숙주의 정상 세포(혈관벽 세포)의 성장을 막기 때문에, 암세포의 다양성과 항암제에 대한 암세포의 내성 형성 등의 기존의 암치료법들이 갖는 한계를 극복하는 탁월한 방법이 된다.

청구의 범위

1. 1) 첫 번째, 네 번째, 여섯 번째 아미노산은 아르기닌이고; 2) 두 번째 아미노산은 아르기닌, 라이신, 히스티딘에서 선택되며; 3) 세 번째, 다섯 번째 아미노산은 아르기닌, 라이신에서 선택된 여섯 개의 아미노산으로 구성된 서열을 포함하는 혈관벽세포 성장호르몬 활성억제 펩티드.

2. 제 1 항에 있어서, 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 펩티드.

3. 제 1 항에 있어서, 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 펩티드.

4. 제 1 항에 있어서, 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 펩티드.

5. 제 1 항의 펩티드를 유효성분으로 하는 항암제용 약학적 조성물.

6. 제 1 항의 펩티드를 유효성분으로 하는 신 혈관형성 관련 질병의 치료제용 약학적 조성물.

요약서

본 발명은 신 혈관형성 유도물질인 혈관벽세포 성장호르몬(vascular endothelial growth factor, 이하 'VEGF'로 약칭함) 활성을 저해하는 새로운 펩티드 및 이를 항암제, 신 혈관형성과 관련된 질병의 치료제로 사용하는 용도에 관한 것으로, 구체적으로는 신 혈관형성을 유도하고 암세포 등에 의해 분비되는 VEGF의 활성을 저해하는 새로운 펩티드 서열을 화학적으로 합성된 펩티드 라이브러리로부터 분리하여 제조하며, 본 발명의 펩티드를 포함하는 약학적 조성물은 암세포의 성장과 전이를 억제하는 항암제 및 신 혈관형성과 관련된 질병의 치료제 등으로 유용하게 사용될 수 있다.